

Über Fehlerquellen bei der
spektrophotometrischen Analyse
zur Identifizierung von E 605

von

HANSGEORG POST

Über Fehlerquellen bei der spektrophotometrischen
Analyse zur Identifizierung von E 605.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen



Vorgelegt von
Hansgeorg P o s t
aus Marburg/L.

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen.

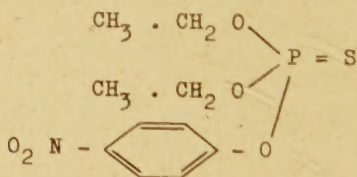
Dekan: Professor Dr. C. K o r t h
Referent: Professor Dr. Dr. E. W e i n i g
Tag der mündlichen Prüfung: 6.2.1957

Inhaltsübersicht:

	Seite
I. <u>Einleitung:</u>	
Die Bedeutung des E 605 für die forensische Medizin.	4
II. <u>Hauptteil:</u>	
A) Die wichtigsten gebräuchlichen Methoden zur Identifizierung von E 605.	5
B) Allgemeine Spektralphotometrie:	
1.) Zusammenhänge zwischen Konstitution und Farbe.	8
2.) Entstehung des Absorptionsspektrums bei aromatischen Nitroverbindungen.	8
C) Experimentelle Spektralphotometrie:	
1.) Frühere Untersuchungen und Methode der spektrophotometrischen Analyse zur Identifizierung von E 605.	10
2.) Eigene Versuche und Besprechung der möglichen Fehlerquellen bei der Durchführung der Methodik.	13
3.) Erweiterung der Methodik, mit dem Ziel der Ausschaltung von Fehlerquellen.	17
4.) Erörterung der Verwertbarkeit des isosbestischen Punktes.	22
III. <u>Schluß:</u>	
1.) Diskussion der Ergebnisse.	24
2.) Zusammenfassung.	25
IV. <u>Literaturverzeichnis.</u>	27

Einleitung.

Im Laufe der letzten Jahre hat das Schädlingsbekämpfungsmittel E 605 mehr und mehr für die Gerichtsmedizin an Bedeutung zugenommen, da es eine erhebliche Toxizität aufweist und oft zu tödlichen Vergiftungen geführt hat. Zahlreiche Methoden sind zur Identifizierung entwickelt worden, um zu einem möglichst sicheren Nachweis zu gelangen, der sich bei der Untersuchung von Organen sehr schwierig gestaltet. Liegt das Mittel aber in unveränderter Form im Mageninhalt vor, kann der Beweis einer Vergiftung eher erbracht werden. Das Mittel selbst ist leicht spaltbar und gering wasserlöslich. Die Tatsache der leichten Spaltbarkeit haben sich viele Untersucher zunutze gemacht und ihre Nachweismethoden auf einen einzigen Bestandteil des Wirkstoffes, das Paranitrophenol, konzentriert, denn der chemischen Zusammensetzung entsprechend ist das E 605 ein Ester der Thiophosphorsäure, wobei zwei Hydroxylgruppen mit Äthylalkohol, die dritte mit Paranitrophenol verestert ist. Die Formel lautet somit:



Diäthyl - p - Nitrophenyl - thiophosphat.

Dieser Ester wird, wie Pfeil anführt, im Organismus unter Bildung von Paranitrophenol bald gespalten. Die weitere Veränderung dessen geht in Richtung auf das Paraaminophenol. Beide Substanzen sind körperfremd, gelangen nur selten in den Organismus, und ihr Nachweis kann, unter der Einschränkung, daß nach Kaiser und Haag bei Anilinvergiftung ebenfalls Paraaminophenol auftreten soll, als beweisend für das Vorliegen einer Vergiftung mit E 605 angesehen werden.

Bevor nun in dieser Arbeit auf die spektrophotometrische Analyse zur Identifizierung von E 605 und der dabei auftretenden Fehlerquellen im besonderen eingegangen wird, sei kurz auf die wichtigsten bisher gebräuchlichen Methoden hingewiesen.

A. Die wichtigsten gebräuchlichen Methoden

zur Identifizierung von E 605.

Alkalikochprobe:

Schwerd und G. Schmidt haben eine einfache Schnellreaktion im Blut als Vorprobe zum Nachweis von E 605 angegeben, die wegen ihrer raschen Durchführbarkeit für klinische Zwecke gedacht war. Der Ester wird durch kurzes Aufkochen mit Natronlauge gespalten und der wirksame Bestandteil, das Diäthyl - p - Nitrophenylthiophosphat, in das stark gelb gefärbte Natriumsalz des Paranitrophenols übergeführt.

In gleicher Weise findet die Alkalikochprobe Verwendung bei der Untersuchung des Mageninhaltes. Da aber Milch oder Milchprodukte in starker Verdünnung, und, wie Kaiser angibt, auch Glukose, Aldehyde und Milchzucker mit Natronlauge eine Gelbfärbung verursachen, so hat die Methode nur bedingten Wert und kann nicht als spezifisch angesehen werden. Sie ist daher auch nur als Vorprobe gedacht und gestattet es, eine akute Vergiftung mit E 605 auszuschließen.

Azofarbstoffbildung:

Die von Averell und Norris entwickelte Methode der Azofarbstoffbildung durch den reduzierten Paranitrophenolester beruht darauf, daß die Nitrogruppe im E 605 - Molekül zur Aminogruppe reduziert und nach Diazotierung einer Kupplungsreaktion unterzogen wird. Beide Autoren haben aber lediglich das Verhalten von E 605 nach Besprühung von Pflanzen untersucht. Die Reaktion unterliegt aber bei toxikologischen Unter-

suchungen anderen Bedingungen, was Kaiser, Haag, Fretwurst und Naeve, und am hiesigen Institut auch Weinig, H. Schmitt und G. Schmidt feststellen konnten, weil störende Einflüsse von aromatischen Aminen und anderen Substanzen das Vorhandensein von E 605 vortäuschten. Daher ist dieser Nachweis von beschränkter Bedeutung, kann aber wegen seiner Empfindlichkeit zum Ausschluß einer Vergiftung herangezogen werden.

Phosphorreaktion:

Das Verfahren beruht auf der Reduktion der Phosphomolybdänsäure zu stabilem Molybdänblau und ist sehr empfindlich. Paulus, Mallach und Janitzki erweiterten diese Methode mit Hilfe einer Phosphorstandardlösung und ermittelten unter Verwendung von bestimmten Reagentien den Phosphorgehalt aliquoter Mengen der E 605 - Standardlösung. Bezüglich der Spezifität kamen sie zu dem Ergebnis, daß bei Benzineextraktion nur organische Phosphorverbindungen vom Phosphatidtyp den Phosphornachweis von E 605 stören können. Zur Erhöhung der E 605 - Spezifität wird die Wasserdampfdestillation im neutralen Bereich empfohlen.

Indophenolblaureaktion:

Sie reagiert auf freies Paranitrophenol und aromatische Nitroverbindungen. Dropmann und v. Eicken haben dabei den Ester erst gespalten, dann mit Titantrichlorid reduziert und danach die Probe mit o-Kresol ausgeführt. Die Modifizierung nach Weinig mit 5 %igem Natriumamalgam gestaltet die Methode eleganter.

Papierchromatographie:

Eine andere Nachweismethode stellt die Papierchromatographie dar, die u.a. von Pfeil und Goldbach angewendet wird. Sie ist aber gegen Verunreinigungen sehr empfindlich und nur dann als brauchbar anzusehen, wenn mehrere parallel laufende Untersuchungen, wie R_F -Wert, Alkali-Gelbfärbung, UV-Absorption und Reaktion mit Millon's Reagens zu einer Übereinstimmung führen.

Spektrophotometrische Messung der Lichtabsorption:

Zur Untersuchung des Mageninhaltes auf E 605 geben Kaiser und Haag eine weitere Möglichkeit an, die auch bereits Derkosch, Fretwurst und Naeve beschreiben. Mit der gleichen Methode haben sich ebenfalls Hirt, Gisclard und Sokol beschäftigt. Sie nehmen das Absorptionsspektrum im UV-Bereich auf. Zur Untersuchung gelangte der Benzolextrakt des Mageninhaltes. Derkosch äthert das Wasserdampfdestillat aus und mißt die Absorption nach Aufnahme des Ätherrückstandes in Alkohol. Die Untersuchungen von Kaiser und Haag von benzolischen Magenextrakten zeigten aber kein befriedigendes Ergebnis, da Benzol in dem in Frage kommenden Gebiet eine starke Eigenabsorption zeigt (200 - 280 $m\mu$). Die Ausmessung nach Derkosch in alkoholischer Lösung ergab Störungen des Absorptionsverlaufes durch eine hohe Konzentration von Begleitstoffen aus organischem Material.

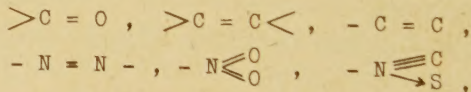
Aus diesem Grunde führte G. Schmidt am hiesigen Institut die Wasserdampfdestillation durch, die auch von anderen Untersuchern, wie Paulus, Wagner, Derkosch, Jansch, Leutner und Mayer für gut brauchbar befunden wurde. Das Vorgehen bietet den Vorteil der besseren Reinigung, denn bekanntlich können viele organische Stoffe, die in Wasser schwer oder sogar unlöslich sind, mit Wasserdampf flüchtig sein. Zur spezifischen Identifizierung von E 605 auf optischem Wege wird nun die spektrophotometrische Ausmessung der Lichtabsorption im UV-Bereich vorgenommen. Diese Messung hat sich bisher gut bewährt und steht der Forderung nach größtmöglicher Sicherheit am nächsten gegenüber.

Zusammenfassend kann somit unter kritischer Wertung der bekannten Verfahren - Abele weist mit Nachdruck darauf hin - gesagt werden, daß für die vorbehaltlose forensische Untersuchung von Leichenteilen bei E 605 - Vergiftung die spektrophotometrische Messung der Lichtabsorption im IR - bzw. UV - Bereich mit erforderlich ist, weil die Beurteilung einer Farbreaktion mit freiem Auge individuellen Schwankungen unterworfen ist und daher zu keinem sicheren Ergebnis führt.

B. Allgemeine Spektralphotometrie.

Aus zahlreichen Versuchen geht hervor, daß man empirische Beziehungen zwischen Konstitution und Farbe chemischer und besonders organischer Verbindungen aufstellte und daraus Schlüsse über die Bindungsverhältnisse solcher Moleküle zog.

Graebe, Liebermann (1868) und Witt (1876) haben erstmalig die Zusammenhänge zwischen Konstitution und Farbe, die durch die Absorption im sichtbaren Spektralbereich bedingt wird, für organische Stoffe durch die Chromophortheorie (Gruppen innerhalb eines Moleküls) systematisch erfaßt. Sie führten das Auftreten von Absorption auf das Vorhandensein bestimmter Atomgruppen zurück. Als bald wurde der Chromophorbegriff auf das nahe Ultraviolett ausgedehnt. In diesem kurzwelligeren Spektralgebiet wird die Absorption durch Gruppen mit doppelten und mehrfachen Bindungen, wie z.B.



ferner durch Benzol und die übrigen aromatischen Ringe und durch freie Radikale, z.B. $(C_6H_5)_3C$ verursacht. Wir haben es dabei mit einer ungesättigten oder aromatischen Konstitution zu tun. Bei aliphatischen gesättigten Verbindungen liegt die Absorption noch kurzwelliger ($\lambda < 2000 \text{ \AA}$).

Durch neu gewonnene physikalische Erkenntnisse über das Wesen der chemischen Bindung, im besonderen durch die Quantentheorie gestützt, ist man zu verschiedenen Vorstellungen gekommen, die für eine umfassende Farbtheorie Bedeutung erlangt haben. Vor allem müssen hierbei die Arbeiten von Kortüm, Eisenbrand und v. Halban erwähnt werden, die sich speziell mit der Lichtabsorption aromatischer Nitroverbindungen befaßt haben. Der nun folgende Abschnitt dieser Arbeit stützt sich im wesentlichen auf die theoretischen Erörterungen dieser Autoren.

So wird die Absorption im sichtbaren und ultravioletten Spektralbereich durch eine Elektronenanregung verursacht. Dabei

spielt nicht nur die Elektronenverteilung des Grundzustandes (unangeregter Molekülzustand), sondern auch der angeregte Molekülzustand durch eine Änderung der Konstitution, wie sie beispielsweise bei der Einführung eines Substituenten zu erkennen ist, eine Rolle. Die Beobachtung, daß nur ungesättigte Verbindungen eine Absorption im Sichtbaren verursachen, ist mit dem Chromophorbegriff gekoppelt worden, was durch die Quantentheorie physikalisch erklärt werden konnte. Demnach gibt es zwei Arten von Elektronenzuständen, die eine unterschiedliche Ladungsverteilung aufweisen. Ein Elektronenpaar erster Art, sogenannte s-Elektronen, mit symmetrischer Ladungsverteilung um die Bindungsrichtung, ist für die einfache Bindung (σ -Bindung), das zweite Elektronenpaar, sogenannte p-Elektronen mit unsymmetrischer Ladungsverteilung für das Zustandekommen der Doppelbindung verantwortlich (π -Bindung). Diese sind locker gebunden, daher leichter anregbar und führen deshalb zur Absorption bei längeren Wellen. Somit wird in diesem Bereich die Absorption durch alle ungesättigten Moleküle (Doppelbindungen u.s.w.) verständlich, da bei ihnen Elektronen mit unsymmetrischer Ladungsverteilung vorhanden sind. Um die Ursache des Anregungszustandes eines Moleküls zu verdeutlichen, sei noch angeführt, daß eine Wechselwirkung zwischen zwei p-Elektronen besteht, d.h. beiden liegt ein unterschiedlicher Energiezustand zugrunde. Das wird durch die verschiedenartige Orientierung der Spins der p-Elektronen ausgedrückt. Beim unangeregten Molekül, das eine negative Wechselwirkungsenergie aufweist, finden wir somit antiparallele Spins, beim angeregten mit positiver Wechselwirkungsenergie dagegen parallele Spins. Das erklärt, daß die Anregung des Moleküls durch die parallelen Spins der beiden p-Elektronen zustande kommt.

Man hat nun für den Zusammenhang zwischen Konstitution und Farbe weiterhin diskutiert, daß sich ein in eine ungesättigte Verbindung eingeführter Substituent auch an der Mesomerie dieser Verbindung beteiligen kann. Damit würde die Einführung eines Substituenten in ein ungesättigtes System

nicht durch einen einzigen einwirkenden Effekt begrenzt. Die Möglichkeit ist dann gegeben, wenn er Elektronenpaare besitzt, die nicht an einer Bindung beteiligt sind. Dazu gehören beispielsweise die $-NH_2$ - oder die $-OH$ - Gruppe. Das gleiche wird auch für die $-CO$ - und die $-NO_2$ - Gruppe angenommen, bei denen Kortüm von "aufrichtbaren Doppelbindungen" spricht, die die "auxochrome", d.h. Farbintensität steigernde Wirkung von Substituenten verursachen sollen. Alle bisher bekannten farbtheoretischen Erörterungen haben aber noch zu keiner völligen Übereinstimmung geführt.

C. Experimentelle Spektralphotometrie.

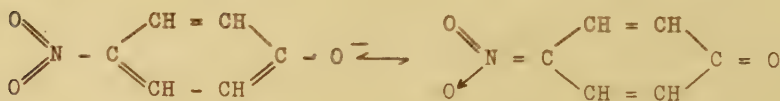
Um das Verständnis zwischen Lichtabsorption und Konstitution zu vertiefen, sind weitere Experimente angestellt worden. Kortüm verwendete dazu einfache aromatische Nitroverbindungen, erweiterte die von Eisenbrand und v. Halban gefundenen Ergebnisse, und ordnete diesen Verbindungen bestimmte Absorptionsbanden in Lösungsspektren zu, wodurch die Konstitutionsaufklärung unbekannter Stoffe gefördert werden konnte. Auch Clar konnte mit der UV-Spektrophotometrie auf dem Gebiet der hoch kondensierten aromatischen Kohlenwasserstoffverbindungen mit Erfolg dazu beitragen, da ja, wie eingangs erwähnt, eine Bande des Absorptionsspektrums durch den Übergang eines Elektrons von einem unteren nach einem oberen Niveau entsteht. Über den Elektronenübergang überlagern sich Kernschwingungen, so daß also nicht nur eine Bande, sondern eine ganze Gruppe von Banden entsteht. Diese werden jedem angeregten oder reaktiven Zustand eines Kohlenwasserstoffes zugeordnet. Je größer der Spektralbereich ist, in welchem die charakteristische Lichtabsorption des Stoffes bekannt ist, desto leichter wird die Identifizierung sein. Es kommt daher auf die Aufnahme einer möglichst vollständigen Absorptionskurve an.

So untersuchte Kortüm verschieden substituierte, aromatische Verbindungen, u.a. auch das Nitrophenol. Die Messungen wurden in wässriger Lösung vorgenommen, die Konzentration je nach Intensität der Absorption zwischen 10^{-5} und 10^{-3} Mol/l variiert. Zusammenfassend kam er dabei zu folgendem Ergebnis:

Führt man einen Substituenten in den Benzolkern ein, so wird die erste Benzolbande nach längeren Wellen verschoben, d.h. der Substituent verursacht die Anregung des Moleküls zur Absorption durch Lockerung der p-Elektronen des Benzolkerns. Die Verschiebung nach längeren Wellen wird um so größer sein, je mehr Doppelbindungen die einzelnen Moleküle aufweisen. Wird nun eine OH - Gruppe in das Nitrobenzol in o- oder m- Stellung eingeführt, verschiebt sich das Maximum der Nitrobenzolbande kaum, lediglich die dritte Benzolhauptbande ins langwellige Gebiet. Das geht aus der Erhöhung des Minimums hervor. Liegt die OH - Gruppe in p-Stellung vor, wird für die Absorption die Verschmelzung der Vorbande und der beiden ersten Hauptbanden des Benzols angenommen, da hier eine einheitliche Bande zu erkennen ist.

Wenn man die Spektren des Paranitrophenols einmal im sauren und dann im alkalischen Medium vergleicht, so fällt auf, daß die längstwellige Vorbande im sauren Medium (Maximum bei $3200 \text{ \AA}$) beträchtlich nach dem langwelligen Gebiet verschoben wird (Maximum bei $4000 \text{ \AA}$). Dadurch ist die Gelbfärbung des Paranitrophenolnatriums bedingt. Kortüm spricht bei der Ausmessung im sauren p_H -Bereich von einem undissoziierten Mononitrophenol, im alkalischen Medium von einem ionisierten Molekül. Diese Form des Moleküls ist aber nicht mit dem Auftreten neuer Banden verbunden und bedingt lediglich eine Verschiebung der Banden, die in den undissoziierten Molekülen bereits vorliegen. Wie im vorhergehenden Abschnitt erwähnt, handelt es sich also hierbei um einen verschiedenartigen Anregungszustand der p-Elektronen beim Benzolkern. Als weitere Ursache für die Bandenverschiebung wird die Entstehung neuer Mesomeriemöglichkeiten durch Protonenabgabe diskutiert. Beim Paranitrophenolnatrium werden dabei folgende Möglichkeiten

angenommen, die beim undissoziierten Molekül nicht auftreten können:



Die Tatsache der Absorption aromatischer Nitroverbindungen im Ultraviolettbereich hat daher auch besondere Bedeutung für die spektrophotometrische Analyse zur Identifizierung von E 605 erhalten. Wie allgemein bekannt ist, genügt es nicht, die Absorptionskurve des Esters allein aufzunehmen, da sehr viele Substanzen, die im Falle einer Vergiftung vorliegen können, wie z.B. Barbiturate, in dem fraglichen Bereich ebenfalls Absorptionsmaxima zeigen, zumal eine Verschiebung von 5 - 10 mμ durchaus möglich ist, weil Temperatur, Konzentration und Lösungsmittel auf die Lage der Maxima einen Einfluß nehmen. Daher ergab sich die Notwendigkeit, das bei der Hydrolyse des E 605 entstehende Paranitrophenol spektrophotometrisch zu erfassen.

Das hat sich G. Schmidt an unserem Institut zur Grundlage gemacht und versucht, auf optischem Wege im Wasserdampfdestillat zu einem möglichst spezifischen Nachweis zu kommen, was nur dann erreichbar ist, wenn jeweils ein frisches Destillat in Anwendung gebracht wird. Er mißt zuerst das reine E 605 bei neutraler oder saurer Reaktion im Ultraviolettbereich und nimmt danach die Kurve des Esters in der Kälte durch Zugabe eines Tropfens 10 %iger Natronlauge auf. Alle drei Kurven zeigen in der Kälte den gleichen Verlauf und stehen damit im Gegensatz zum freien Paranitrophenol, das im Alkalischen gegenüber dem sauren und neutralen Bereich eine deutliche Abweichung aufweist. Jetzt wird der alkalisierte Ester durch ein einmaliges Aufkochen gespalten und nach dem Abkühlen erneut gemessen. Man erhält nun die Kurve des gelb gefärbten Natriumsalzes des Paranitrophenols. Die im Anschluß daran folgende Ansäuerung mit Salzsäure setzt Paranitrophenol frei, was in der Absorptionskurve durch eine Verschiebung des Maximums zum Ausdruck kommt.

In Anlehnung an diese Methodik stellten wir nun Versuche an, die vom reinen Paranitrophenol ausgingen. Die Absorptionskurven wurden mit dem Spektrophotometer von Zeiß-Opton mit Monochromator M 4 Q im Ultraviolettlicht aufgenommen. Als Lösungsmittel kam nur destilliertes Wasser zur Anwendung, die Schichtdicke der Quarzküvetten betrug 1 cm.

Zunächst versetzten wir Paranitrophenol (100 mg%ige Lösung) mit einem Tropfen 20 %iger Natronlauge und ermittelten die Farbkurve des entstandenen Paranitrophenolnatriums. Danach wurde wiederum reines Paranitrophenol in einem zweiten Versuch mit einem Tropfen 25 %iger Salzsäure angesäuert und ausgemessen. Dabei konnten wir feststellen, daß bei beiden Kurven eine Verschiebung des Minimums nach längeren Wellen zu verzeichnen war (15 - 20 m μ). Außerdem zeigte der Anstieg bei der Paranitrophenolnatriumkurve einen ansteigenden und einen waagrechten Wendepunkt. Da die auf diese Weise gefundenen Ergebnisse eine geringe Abweichung zeigten, wurde der Analysengang von G. Schmidt auf das Paranitrophenol angewendet, um festzustellen, ob dabei derselbe Effekt auftreten würde. Wir gingen dazu folgendermaßen vor:

Erst Aufnahme der Absorption von Paranitrophenol unter Zugabe von einem Tropfen Natronlauge, dann Ansäuerung mit einem Tropfen HCl und erneute Ausmessung. Dabei wurde festgestellt, daß in der gleichen Weise wie beim vorhergehenden Versuch eine Störung des normalen Kurververlaufs im Bereich von 220 bis 330 m μ auftrat. Ferner wurde bemerkt, daß die Kurve des freien Paranitrophenols, welche sich ja nach dem Ansäuern bildet, eine sehr starke Abweichung von der typischen Farbkurve zeigt. (Abb. 1)

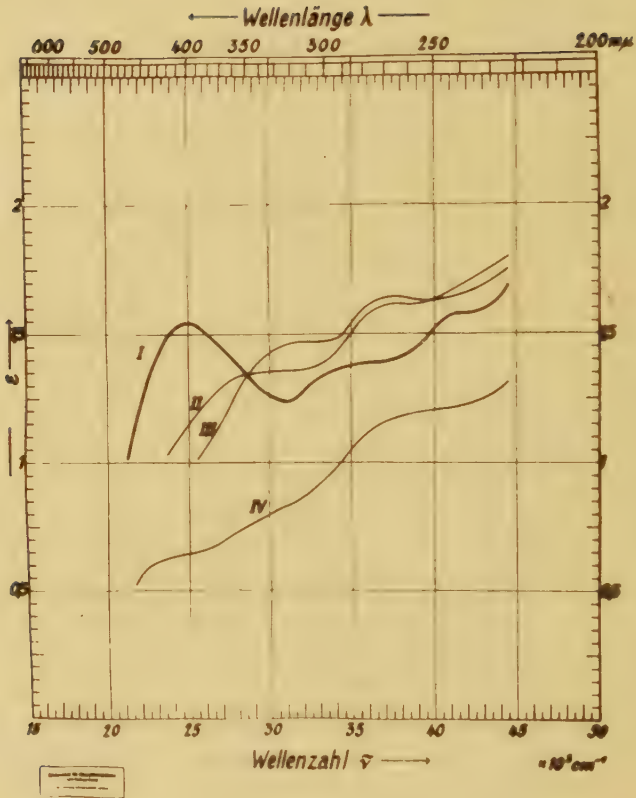


Abbildung 1:

- I Paranitrophenolat in H_2O gegen H_2O
- II $\text{NaOH} + \text{HCl}$ in H_2O gegen H_2O
- III Paranitrophenolat + HCl in H_2O gegen H_2O
- IV NaCl in H_2O gegen H_2O

$$E = \log I_0 / I$$

Sie steigt, wie aus Abb. 1, III ersichtlich, bis zu einer Wellenlänge von $330\text{ m}\mu$ an, verläuft dann geradlinig, um nach einem Wendepunkt weiter in Richtung auf das kurzwellige Gebiet anzusteigen. Der Unterschied zur typischen Farbkurve geht aus Abb. 3, II hervor. Es handelte sich also um eine Störung, die auch dann bestehen blieb, wenn wir die Alkalisierung mit NH_4OH und die folgende Ansäuerung mit einem Tropfen konz. H_2SO_4 vornahmen.

Als Grund für diese Tatsache kann man verschiedene Möglichkeiten annehmen. Kortüm weist darauf hin, daß äußere Bedingungen die Abhängigkeit des Absorptionsspektrums beeinflussen können. So verschieben sich die Banden in Höhe, Lage und Form durch eine stärkere Änderung der Temperatur (über ± 1 Grad). Das konnte in unserem Falle aber unberücksichtigt bleiben, da sämtliche Messungen unter konstanten Temperaturverhältnissen ausgeführt wurden. Eine weitere Fehlermöglichkeit im UV-Bereich ist durch nicht sichtbare Verunreinigungen gegeben, wenn die optischen Flächen nicht peinlich sauber gehalten werden, da manche Substanzen, z.B. Säuren von den Wänden der Quarzgefäße stark adsorbiert werden. Wir verwendeten aber stark verdünnte Lösungen, so daß die Sauberhaltung keine Schwierigkeit bereitete und damit dieses Problem weitgehend außer Betracht kam. Besondere Vorsicht ist ferner bei geringen Verunreinigungen geboten, die sich nicht nur auf den zu untersuchenden Stoff, sondern auch auf das verwendete Lösungsmittel beziehen.

Bei der bei uns aufgetretenen Störung lag die Vermutung nahe, daß es sich um einen "Salzeffekt" handeln würde, der die typische Gestalt des Absorptionsspektrums durch Überlagerung beeinträchtigte. Das ergab sich schon durch die Beobachtung, daß beim Alkalisieren von reinem Paranitrophenol die charakteristische Absorptionskurve der dabei entstehenden Natriumverbindung im Wellenbereich von 300 bis $220\text{ m}\mu$ eine vorher schon angeführte Abweichung aufwies. Um dafür einen genaueren Anhaltspunkt zu bekommen, versetzten wir reines Paranitrophenol in wässriger Lösung mit verschiedenen Reagentien. (Abb. 2)

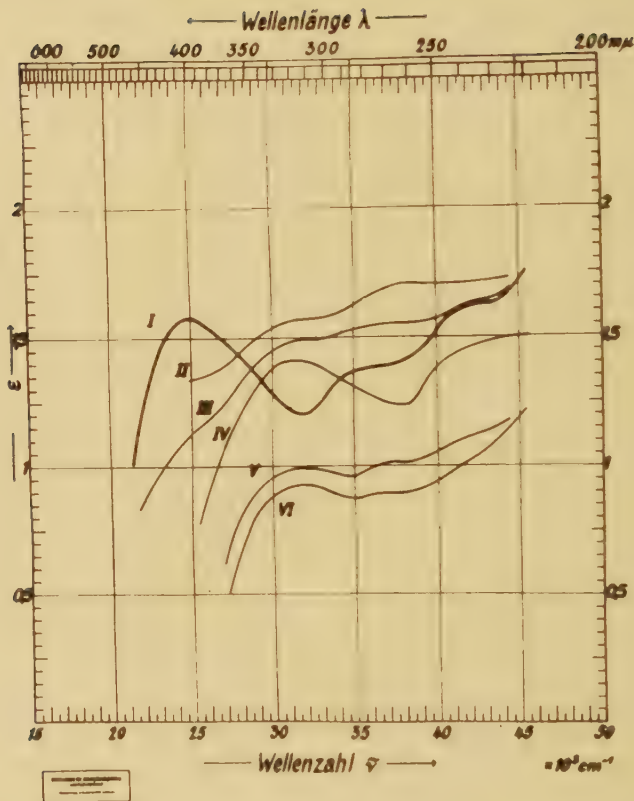


Abbildung 2:

I	Paranitrophenolat	in H_2O	gegen H_2O
II	Paranitrophenol + Na_2SO_4	in H_2O	gegen H_2O
III	Paranitrophenol + $NaCl$	in H_2O	gegen H_2O
IV	Paranitrophenol + HCl	in H_2O	gegen H_2O
V	Paranitrophenol + $CaCl_2$	in H_2O	gegen H_2O
VI	Paranitrophenol + KCl	in H_2O	gegen H_2O

$$\epsilon = \log I_0 / I$$

Wie aus Abb. 2 zu erkennen ist, absorbieren dabei K, Ca und Natrium in merklichem Maße im Ultraviolettbereich und können daher für eine Absorptionsstörung in Betracht gezogen werden.

Alle bisher durchgeführten Versuche wurden so gehandhabt, daß die Analysenküvette die in Wasser gelöste Substanz, bzw. mit dem hinzugefügten Reagens, die Vergleichsküvette das Lösungsmittel, destilliertes Wasser allein enthielt. Kortüm empfiehlt aber in seinen Betrachtungen über die Kolorimetrie und Spektralphotometrie die Herstellung von Vergleichslösungen, damit das Absorptionsspektrum seine wirkliche Form beibehält, und führt dazu unter anderem aus:

"Die Unannehmlichkeit der Herstellung einer Vergleichslösung wird durch den bedeutenden Gewinn an Sicherheit des Meßresultates weitaus aufgewogen. Die Verwendung von Vergleichslösungen stellt daher auch bei häufig wiederholten Messungen oder Meßreihen auf die Dauer gesehen keinen Zeitverlust dar und garantiert bei sauberem Arbeiten stets die Erreichung der maximal möglichen Genauigkeit. Bei höheren Genauigkeitsansprüchen ist man darauf angewiesen, bei Benutzung des Spektralphotometers mit Vergleichslösungen möglichst ähnlicher Konzentration zu arbeiten, wie sie die zu untersuchende Lösung besitzt, damit man stets bei gleicher Extinktion mißt."

Andrews und Keefer sind bei der Ausmessung der Gleichgewichtslagen von Komplexen, die bei der Dienaddition mit aromatischen Verbindungen entstehen, in ähnlicher Weise vorgegangen. Sie mischten bekannte Volumina aromatischer Substanzen und der chinoiden Komponente in Chloroformlösung und nahmen das Absorptionsspektrum der Mischung gegen eine Lösung gleicher Konzentration der aromatischen Substanz in Chloroform, wie in der Probe, auf. Die aromatische Komponente nahm somit keinen störenden Einfluß auf die typische Farbkurve des Komplexes.

Deshalb stellten wir in Abänderung der bisherigen Methode eine neue Versuchsreihe an, wobei sich der Analysengang wie folgt gestaltete:

- 1.) Aus einer wässrigen Paranitrophenollösung von bekannter Konzentration ($c = 10^{-3}$ Mol/l) werden 3 ml entnommen, mit 1 ml frisch bereiteter Natronlauge ($c = 1$ Mol/l) versetzt und mit Aqua destillata ad 100 ml aufgefüllt. Die Vergleichslösung enthält in

100 ml Wasser 1 ml Natronlauge der gleichen Konzentration. Jetzt wird die Absorptionskurve aufgenommen.
(Abb. 3, I)

- 2.) 3 ml Paranitrophenol der Stammlösung werden mit 1 ml Natronlauge alkalisiert und dann durch Zugabe von 3 ml HCl ($c = 1$ Mol pro Liter) angesäuert. Dann folgt Auffüllung des Gemisches mit Aqua dest. ad 100 ml. Die dazu hergestellte Vergleichslösung besteht aus 1 ml Na OH und 3 ml HCl der gleichen Konzentration und ist wiederum mit Wasser bis zu 100 ml aufgefüllt. Nun erfolgt die Absorptionsmessung. (Abb. 3, II)

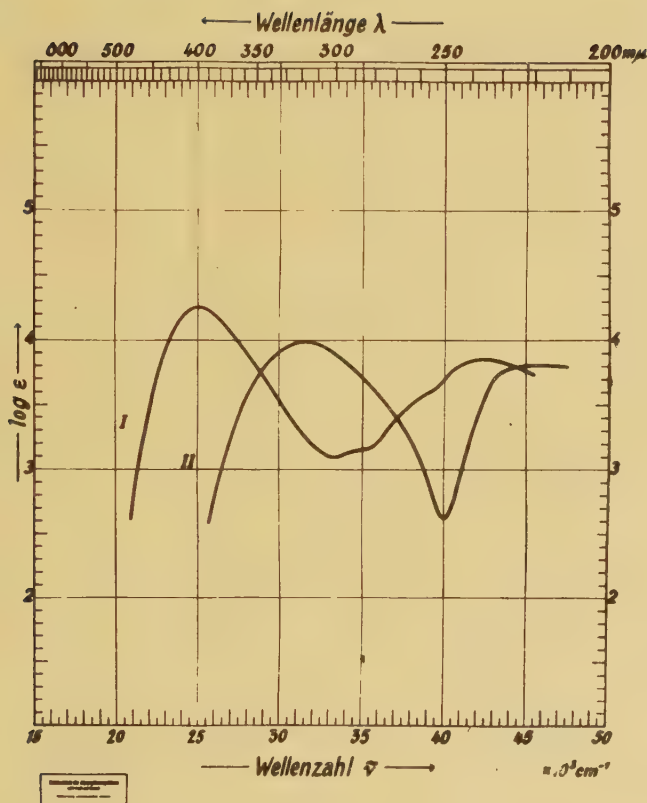


Abbildung 3:

- I Paranitrophenolat in H_2O gegen NaOH gleicher Konzentration in H_2O
- II Paranitrophenolat + HCl in H_2O gegen NaOH + HCl gleicher Konzentration in H_2O

Aus der Abbildung 3 geht nun hervor, daß die vorher aufgetretenen Störungen dadurch zu beseitigen sind, daß man in die Vergleichsküvette Lauge oder Lauge + Säure gleicher Konzentration hineingibt. Die typischen Kurven werden so erkenntlich.

Wir wendeten nun diesen Analysengang auch auf die spektrophotometrische Identifizierung von E 605 an, um den an sich schon spezifischen Nachweis noch sicherer zu gestalten, und gingen dabei nach der von G. Schmidt angegebenen Methodik vor.

- 1.) Ausmessung des unveränderten E 605 - Wasserdampfdestillates bei neutraler, saurer und alkalischer Reaktion gegen Wasser in der Kälte. (Abb. 4, III)
- 2.) 1 ml frisches E 605 - Wasserdampfdestillat wird mit 3 ml Natronlauge ($c = 1 \text{ Mol/l}$) versetzt und aufgekocht. Der Ester ist nun gespalten. Nach dem Abkühlen Ausmessung gegen eine Vergleichslösung von 3 ml NaOH gleicher Konzentration und 1 ml Aqua dest. (Abb. 4, I)
- 3.) Durch Säurezugabe wird Paranitrophenol frei gemacht, wozu eine neue Lösung hergestellt wurde.
1 ml E 605 - Destillat wird nach Zugabe von 3 ml NaOH ($c = 1 \text{ Mol/l}$) aufgekocht, dadurch gespalten und nach dem Abkühlen mit 3 ml HCl ($c = 1 \text{ Mol/l}$) angesäuert. Die notwendige Vergleichslösung enthält jeweils 3 ml HCl und NaOH der vorher angegebenen Konzentration und 1 ml Wasser. Nun wird die Absorptionskurve ermittelt. (Abb. 4, II)

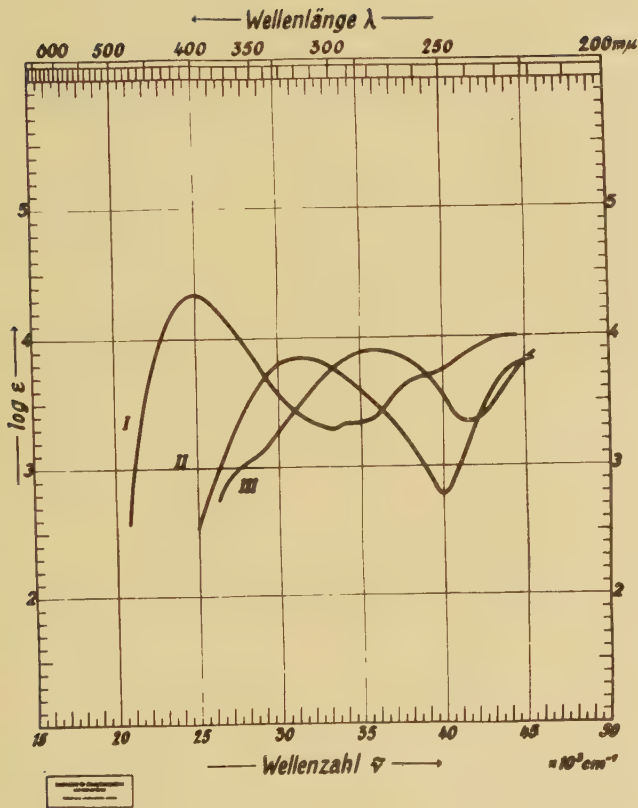


Abbildung 4:

- I E 605 nach Spaltung mit NaOH in H_2O gegen NaOH gleicher Konzentration in H_2O
- II E 605 nach Spaltung mit NaOH und anschließender Ansäuerung mit HCl in H_2O gegen NaOH + HCl gleicher Konzentration in H_2O
- III Reines E 605 bei neutraler, saurer oder alkalischer Reaktion in H_2O gegen H_2O

Die Ergebnisse sind aus Abb. 4 ersichtlich und stehen mit denen der in Abb. 3 gefundenen in völliger Übereinstimmung, d.h. dieses Vorgehen läßt sich mit Sicherheit auf die spektrophotometrische Identifizierung von E 605 anwenden.

Die Kurven wurden nach dem von Pestemer und Soheibe zur einheitlichen Darstellung der Lichtabsorption von Lösungen empfohlenen Verfahren aufgezeichnet. Auf die Ordinate trägt man den molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten $\mathcal{E}$, auf der Abszisse die Wellenlänge in $m\mu$ bzw. die Wellenzahl in $\tilde{\nu}$ ein. Die Umrechnung wird durch die Rechenschablone von Krempel und Fauß erleichtert, die in der Ordinate logarithmisch geteilt ist und den meßbaren Extinktionsbereich von 0,01 bis 2 umfaßt. Das dient zur Umrechnung der Extinktion in den Logarithmus des Extinktionskoeffizienten, der durch das Lambert - Bouger - Beer'sche Gesetz definiert ist:

$$E = \log I_0 / I = \mathcal{E} \cdot c \cdot d$$

Das Zeichenblatt, das auf die Schablone aufgelegt wird, ist ein Transparentpapier mit Einteilung der Zehnerpotenzen des $\log \mathcal{E}$ und der Wellenzahlen und dient zur sofortigen Aufzeichnung der endgültigen Kurve.

Es interessierte nun noch die Frage, ob man das Gleichgewicht zwischen Paranitrophenol und Paranitrophenolnatrium bei nicht vollständiger Verseifung, d.h. indem Paranitrophenol und Paranitrophenolnatrium in einem bestimmten Gleichgewicht vorhanden sind, nachweisen kann. Zur Klärung dieses Problems kann man den isosbestischen Punkt heranziehen. Der isosbestische Punkt ist jener ausgezeichnete Punkt zweier Absorptionskurven, der sich bei Konzentrationsänderung der einzelnen Komponenten wellenlängen- und extinktionsunabhängig verhält. Schläfer und Kling haben ein einfaches Verfahren für die Ermittlung des isosbestischen Punktes angegeben. Sie superponieren die Extinktionswerte der einzelnen Komponenten,

die in wechselnden Konzentrationen vorliegen und erhalten so aus den Summenkurven die Koordinaten der zu erwartenden isosbestischen Punkte.

Bei der Addition der Absorptionskurven von Paranitrophenol und Paranitrophenolnatrium in einem $\lambda/\log E$ Diagramm konnte kein isosbestischer Punkt gefunden werden, sondern man erhielt nur parallel verschobene gleichartige Kurven.

Desgleichen kann man keine einwandfreie Entscheidung über die Natur des beim Alkalisieren von Paranitrophenol entstehenden Stoffes an Hand der Absorptionskurve treffen. Es scheint kein Gleichgewicht zwischen benzoider und chinoider Komponente vorzuliegen, da ja derartige Gleichgewichte von der Verdünnung abhängig sind und somit eine Verschiebung des Maximums nach längeren oder kürzeren Wellen zu beobachten sein müßte.

Diskussion der Ergebnisse.

Es konnte durch die Versuche gezeigt werden, daß es für die Aufnahme des Spektrums von Paranitrophenol und Paranitrophenolnatrium wesentlich ist, daß man die der Analysenküvette zugesetzten Reagentien auch in die Vergleichsküvette geben muß. Geschieht das nicht, so ist eine Veränderung der Paranitrophenolnatriumkurve in dem Bereich, in dem Benzol- und Phenolanteile absorbieren, zu beobachten, während das durch Lockerung der p-Elektronen des Benzolkerns verschobene erste Maximum keinerlei Veränderungen erfährt. Die gleiche Tatsache haben wir in weit stärkerem Maße bei der Kurve des Paranitrophenols bei NaCl-Zusatz. Es kann sogar so weit gehen, daß das bei 250 $m\mu$ vorhandene Minimum vollkommen ausgeglichen und nur noch ein waagrechter Wendepunkt wird. Diese Erscheinung ist an sich nicht verwunderlich, da die Erdalkali- und Alkalimetalle leicht ihre Elektronen abgeben, somit den verschiedensten Anregungszuständen zugänglich sind und deshalb in dem Bereich von 220 - 300 $m\mu$ ebenfalls merklich absorbieren. Aus Abbildung 2 geht außerdem hervor, daß das Anion eines Salzes keinen Einfluß auf den Kurvenverlauf ausübt, was ja schon durch die Tatsache, daß die Paranitrophenolkurve bei Salzsäurezusatz keine Veränderung erfährt, bewiesen wird. Damit man nun eine gute Reproduzierbarkeit der Kurven, die von allen äußeren Analysenbedingungen unabhängig sind, erhält, ist es notwendig, die Reagenslösungen in die Vergleichsküvette zu geben.

Zusammenfassung:

- 1.) Es wird über die wichtigsten gebräuchlichen Methoden chemischer Art zum Nachweis von E 605 berichtet unter Hinweis darauf, daß für die vorbehaltlose Untersuchung von Leichenteilen bei E 605 - Vergiftung die spektrophotometrische Messung der Lichtabsorption von außerordentlicher Wichtigkeit ist.
- 2.) Nach einer allgemeinen Ausführung über die Entstehungsmöglichkeiten des Absorptionsspektrums bei aromatischen Nitroverbindungen werden die bisherigen Untersuchungsergebnisse angeführt und die spektrophotometrische Methode zur Identifizierung von E 605 erläutert.
- 3.) Die durch eigene Versuche erhaltenen Absorptionsspektren werden mit den typischen molaren Absorptionskurven verglichen. Hierbei wurde die Feststellung getroffen, daß Störungen im kurzwelligen Ultraviolett auftreten, die die typische Gestalt der Farbkurven verändern. In weiteren Experimenten wird versucht, diese als "Salzeffekt" gedeuteten Störungen zu klären. Dabei wird beobachtet, daß Erdalkali- und Alkalimetalle merklich im Ultraviolettbereich absorbieren. Diese Erscheinung muß für eine Abweichung der Kurven unbedingt in Betracht gezogen werden.
- 4.) Um diese Störungen auszuschalten, wird die von Kortüm empfohlene Methode angewendet, nach der die der Analysenküvette zugeführten Substanzen auch der Vergleichsküvette beigelegt werden müssen. Durch dieses Vorgehen werden auftretende Fehler beseitigt. Die gleiche Methode wird auf die spektrophotometrische Analyse zur Identifizierung von E 605 übertragen, wodurch der an sich schon spezifische Nachweis noch sicherer gestaltet wird.

Für die Überlassung des Themas und die Förderung und Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit möchte ich hiermit Herrn Professor Dr. Dr. E. Weinig meinen verbindlichsten Dank aussprechen.

Herrn O. Opitz danke ich bestens für die Hilfe bei der Ausführung der fotografischen Arbeiten.

Literaturverzeichnis:

- Abele, G.: Kritische Betrachtungen über den Nachweis und die quantitative Bestimmung von O,O - Diäthyl - O - p - Nitrophenylmonothiophosphat ("E 605").
Deutsches Medizin. Journal 5, 681 (1954).
- Andrews, L.J.
u. R.M. Keefer: The Interaction of Dienophiles with Aromatic Substances.
J.Am.Chem.Soc. 66. Jhrgg., 553 (1954).
- Clar, E.: Das Anellierungsverfahren zur Untersuchung der Absorptionsspektren der aromatischen Kohlenwasserstoffe.
Atti d.X.Congr.Intern.d.Chimica Roma 2, 213 (1938)
Chem.Ber. 82, 495 (1949).
- Derkosch, J.,
Jansch, H., Leutner, R.
u. F.X. Mayer: Zum Nachweis des Schädlingsbekämpfungsmittels E 605.
M.f.Chem. 85, 684 (1954).
- Dropmann, P.: Nachweis des Schädlingsbekämpfungsmittels E 605.
Dtsch.Med.Wschr. 77, 372 (1953).
- Eicken, S.v.: Zur Ausscheidung von p-Nitrophenol im Urin nach Einwirkung von Pflanzenschutzmittel "E 605".
Angew.Chem. 66, 551 (1954).
- Eisenbrand, J.
u. H.v.Halban: Über die Lichtabsorption der Nitrophenole.
Z.physik.Chem. (A) 146, 30, 101, 111 (1930).
- Kaiser, H.
u. Th.Haag: Zum chem.-toxikolog. Nachweis von E 605 "Bayer" sowie einiger anderer Insektizide der Thiophosphorsäurereihe.
Arch.d.Pharmazie 61, 542 (1954).
- Kortüm, G.: Kolorimetrie und Spektralphotometrie.
Bd. II, 2, 14, 177 (1942).
- Kortüm, G.: Über die Zuordnung von Elektronenbanden in Lösungsspektren.
Z.f.physik.Chem. (B) 42, 39 (1939).

Kremann, R.:

Zusammenhänge zwischen physikalischen Eigenschaften und chemischer Konstitution.
Wissenschaftl. Forschungsberichte Naturwissenschaftl. Reihe 41, 106 (1937).

Paulus, W.,
Mallach, J.
u. U. Janitzki:

Zum Nachweis des E 605.
Arzneimittelforsch. 5, 241 (1955).

Pestemer, M.
u. G. Scheibe:

Über die einheitliche Darstellung der Lichtabsorption von Lösungen im Sichtbaren und Ultraviolett.
Angew. Chem. 66, 553 (1954).

Pfeil, E.:

Über den Nachweis von "E 605".
Röntgen- u. Laborat.Prax. 7, 147 (1954).

Pfeil, E.
u. H.J. Goldbach:

Qualitative und quantitative Bestimmung von "E 605" in biologischem Material.
Klin.Wschr. 31, 1011 (1953).

Schläfer, H.L.
u. O. Kling:

Bedeutung isosbestischer Punkte für die spektrophotometrische Untersuchung chemischer Zeitreaktionen und Gleichgewichte.
Angew.Chem. 68, 667 (1956).

Schmidt, G.:

Toxikologische Erfahrungen bei E 605-Vergiftungen.
Arch.f.Toxikologie 15, 361 (1955).

Schwerd, W.
u. G. Schmidt:

Einfache Schnellreaktion im Blut zum Nachweis von Vergiftungen mit dem Schädlingsbekämpfungsmittel E 605.
Dtsch.Med.Wschr. 77, 372 (1952).

Weinig, E., H. Schmitt
u. G. Schmidt:

Zum Beweiswert der Reaktion von Averell und Norris beim Nachweis von E 605.
Arch.f.Toxikologie 15, 423 (1955).

Weinig, E.:

Diskussionsbemerkung z. Vortrag von E. Burger über Beiträge zum Nachweis von E 605 (Untersuchungen über die Dauer der Nachweisbarkeit, eine neue Methode zum Nachweis kleinster Mengen p-Nitrophenol).
Tagung d. Dtsch. Ges. f. Ger. u. Soz. Medizin, Marburg 1.-3.X.1956.

Lebenslauf.

Am 30.10.1926 wurde ich, Hansgeorg Post, als Sohn des Facharztes Dr. Willy Post und seiner Ehefrau Gussie, geb. Bähre, in Marburg an der Lahn geboren.

Die Grundschule besuchte ich in Marienburg/Wpr. von 1933 ab und trat 1937 in die dortige Oberschule für Jungen ein. Nachdem meine Eltern 1940 nach Thorn verzogen waren, konnte ich dort meine Schulausbildung bis zum Übertritt in die 8. Klasse im Jahre 1944 fortsetzen und erhielt den Reifevermerk.

Am 2. Januar 1945 wurde ich zum R.A.D. einberufen. Die Einheit, der ich angehörte, wurde im April des gleichen Jahres aufgelöst.

Nach Zusammenführung der Familie im Juli 1945 erhielt mein Vater im November die Zulassung zur Niederlassung in Fürth/Bayern. Hier absolvierte ich im Juli 1947 am Gymnasium einen Abiturientenkurs für Kriegsteilnehmer und erhielt das Reifezeugnis.

Bis zum Beginn des Studiums im Jahre 1949 arbeitete ich in der Praxis meines Vaters mit. Die ärztliche Vorprüfung legte ich im Wintersemester 1951/52 an der Universität Erlangen ab und beendete das Studium mit dem Staatsexamen während des Sommersemesters 1955.

In der Zeit vom März 1956 bis Januar 1957 arbeitete ich an der Dissertation im Institut für Gerichtliche Medizin der Universität Erlangen.

